

Heparina e Na₂EDTA como anticoagulantes para surubim híbrido (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *P. corruscans*): eficácia e alterações hematológicas

Heparin and Na₂EDTA as anticoagulants for hybrid surubim catfish (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *P. corruscans*): efficacy and hematological changes

Márcia Mayumi Ishikawa^{I*} Santiago Benites de Pádua^{II} Fabiana Satake^{III} Hamilton Hisano^I
Gabriela Tomas Jerônimo^{IV} Maurício Laterça Martins^{IV}

RESUMO

Este estudo avaliou o efeito da heparina 100UI e do Na₂EDTA nas concentrações de 3, 5 e 10% sobre a coagulação sanguínea e os parâmetros hematológicos de surubim híbrido. Foram utilizados 10 peixes, com peso médio de 386,7±24,3g e comprimento total médio de 38,7±6,4cm, para coleta das amostras sanguíneas e determinação do percentual do hematócrito, teor de proteínas plasmáticas totais e teste de fragilidade osmótica dos eritrócitos (FOE). Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. A coagulação foi eficientemente inibida quando utilizado o Na₂EDTA; já as amostras com heparina coagularam 10 horas após a coleta. Houve aumento na fragilidade osmótica dos eritrócitos ($P<0,01$), especialmente quando utilizado o Na EDTA 10 e 5%, não havendo diferença entre o controle e a heparina. No hematócrito e teor de proteínas plasmáticas totais, não foram verificadas diferenças significativas. O Na₂EDTA 3% é seguro e eficiente como anticoagulante para surubim híbrido, prevenindo a coagulação por mais de 10h e ocasionando discreto efeito sobre a fragilidade osmótica dos eritrócitos.

Palavras-chave: anticoagulante, coagulação, hematologia de peixes, *Pseudoplatystoma* sp.

ABSTRACT

The effect of heparin 100IU and Na₂EDTA in concentration of 3%, 5% and 10% on the blood coagulation and hematological parameters of hybrid surubim catfish were evaluated. We used ten fish weighing 386,7±24,3g and average length of 38,7±6,4cm for collection of blood samples and

determination of the percentage of hematocrit, plasma total protein content and osmotic fragility erythrocytes test (OFE). Data were submitted to analysis of variance and averages compared by Tukey test at 5% probability. Coagulation was efficiently inhibited when used the Na₂EDTA, while the samples with heparin coagulate ten hours after collection. There was an increase in osmotic fragility of erythrocytes ($P<0.01$), especially when using Na₂EDTA 10% and 5%, with no difference between control and heparin. In hematocrit and total plasma protein content were not observed statistical differences. The Na₂EDTA 3% is safe and effective anticoagulant for hybrid surubim catfish, preventing clotting for more than 10 hours causing slight effect on the osmotic fragility of erythrocytes.

Key words: anticoagulant, coagulation, fish hematology, *Pseudoplatystoma* sp.

INTRODUÇÃO

A hematologia tem sido amplamente utilizada como importante ferramenta para o monitoramento do estado de saúde de peixes em cultivo, permitindo inferências sobre suas condições de higidez. No entanto, alguns anticoagulantes utilizados podem determinar limitações durante o processamento das amostras sanguíneas, ocasionando alterações *in vitro* na determinação dos parâmetros hematológicos (HATTINGH, 1975; VAN VLIET et al., 1985; TAVARES-DIAS & SANDRIM, 1998; WALENCIK & WITESKA,

^IPesquisadores da Embrapa Agropecuária Oeste, BR 163, km 253,6, CP 661, 79804-970, Dourados, MS, Brasil. E-mail: marcia@cpao.embrapa.br. *Autor para correspondência.

^{II}Faculdade Anhanguera, Dourados, MS, Brasil.

^{III}Centro Universitário da Grande Dourados, Dourados, MS, Brasil.

^{IV}Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brasil.

2007). Nesse sentido, MAINWARING & ROWLEY (1985) citam que a utilização de anticoagulante eficiente e adequado torna-se essencial para os procedimentos hematológicos e imunológicos.

A hemólise está entre as principais alterações ocasionadas pela utilização de anticoagulantes inadequados (HATTINGH, 1975; HATTINGH & SMITH, 1976; HARR et al., 2005; MAFUVADZE & ERLWANGER, 2007; WALENCIK & WITESKA, 2007), havendo relatos de coagulação (HATTINGH, 1975; CLARKE et al., 1979; MAINWARING & ROWLEY, 1985), aumento do volume dos eritrócitos (HATTINGH, 1975; HATTINGH & SMITH, 1976; MAFUVADZE & ERLWANGER, 2007), diminuição no número de leucócitos (MAINWARING & ROWLEY, 1985), assim como alterações morfológicas nas células sanguíneas (MAINWARING & ROWLEY, 1985; WALENCIK & WITESKA, 2007) e incremento das espécies reativas de oxigênio (WALENCIK & WITESKA, 2007).

TAVARES-DIAS & SANDRIM (1998), assim como WALENCIK & WITESKA (2007), citam que a heparina é o anticoagulante mais utilizado em peixes, seguido pelo ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA). A atividade anticoagulante exercida pela heparina é promovida devido à aceleração da atividade da antitrombina III, que, por sua vez, inibe a ação da trombina e de outras proteases responsáveis pela cascata da coagulação (HARR et al., 2005). Já o EDTA ocasiona a quelatação do fator IV (Ca^{2+}) na cascata da coagulação, sendo essencial em várias etapas da coagulação e atuando como um mediador, bem como na relação célula a célula durante as reações da coagulação (HARR et al., 2005; TAVARES-DIAS & OLIVEIRA, 2009).

Este estudo teve por objetivo avaliar o efeito da heparina e do Na_2EDTA sobre a coagulação sanguínea e os parâmetros hematológicos de surubim híbrido (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *P. corruscans*).

MATERIAL E MÉTODOS

Dez peixes aparentemente hígidos e sem lesões superficiais com peso médio de $386,7 \pm 24,3$ g e comprimento total médio de $38,7 \pm 6,4$ cm foram mantidos em tanques circulares com capacidade de 1.000 L, com fluxo contínuo de água proveniente de poço artesiano (10 L min^{-1}) no Laboratório de Piscicultura da Embrapa Agropecuária Oeste, em Dourados, Mato Grosso do Sul.

Os peixes foram alimentados com ração comercial para carnívoros (45% PB, 8-10mm), fornecida em duas parcelas ao dia. Semanalmente, foi realizada a

limpeza do tanque de manutenção, por meio de sifonagem para a retirada de eventuais resíduos orgânicos (fezes e sobras de ração).

Após a captura, os peixes foram contidos mecanicamente com pano umedecido e realizada venopunção dentro de poucos segundos, de forma a minimizar os efeitos do estresse agudo provocado pela captura, visto que a contenção química por fármacos anestésicos pode determinar a ocorrência de hemólise em peixes (KORCOCK et al., 1988). Procedeu-se à venopunção caudal, com auxílio de seringas descartáveis de 5 mL e agulhas hipodérmicas 30x8mm desprovidas de anticoagulante, sendo puncionados 2,5 mL por indivíduo. (Comitê de Ética 23080.0 29979/2009-05/CEUA/UFSC)

O sangue foi distribuído em igual volume de 0,5 mL, em cinco tubos de polietileno (1,5 mL). A primeira alíquota foi acondicionada em tubo isento de anticoagulante (controle) e nos demais tubos com as seguintes concentrações de anticoagulantes: 15 μL de Na_2EDTA 3% ($0,3 \text{ mg mL}^{-1}$ de sangue), 15 μL de Na_2EDTA 5% ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ de sangue), 15 μL de Na_2EDTA 10% (1 mg mL^{-1} de sangue) e 15 μL de Heparina 100UI ($1,5 \text{ UI mL}^{-1}$ de sangue), após diluição a partir da heparina 5.000UI em solução fisiológica a 0,65% (1:50).

Procedeu-se à dosagem do hematócrito (Ht) pela técnica do microhematócrito (GOLDENFARB et al., 1971) e teor de proteínas plasmáticas totais (PPT), com a utilização de refratômetro portátil.

Para determinação da fragilidade osmótica dos eritrócitos (FOE), utilizou-se solução salina tamponada (pH 7,4), conforme descrito por PARPART et al. (1947). As diluições em série foram feitas a partir da solução estoque a 10,5%, sendo utilizadas as seguintes concentrações: 0,65; 0,55; 0,45; 0,35; 0,25; 0,15 e 0,05% de NaCl-PO_4 . Foram utilizadas diluições de 1:100 de sangue nas respectivas concentrações estudadas, sendo mantidas em temperatura ambiente e realizadas três homogeneizações a cada 10 minutos; após 30 minutos, as soluções foram centrifugadas durante cinco minutos a 2.000 rpm e foi realizada a dosagem de hemoglobina no sobrenadante de acordo com COLLIER (1944). Para obtenção da absorbância em espectrofotômetro, utilizou-se a diluição de 1:50 do sobrenadante da solução previamente centrifugada em solução de Drabkin.

Imediatamente após a alíquotagem do sangue nos tubos de polietileno, procedeu-se à incubação do sangue do grupo controle nas soluções salinas tamponadas para o teste da FOE, antes que ocorresse o comprometimento da amostra pela ativação da cascata da coagulação. A realização da FOE no sangue mantido com os diferentes anticoagulantes foi

realizada após 15 minutos da coleta sanguínea. O sangue remanescente foi estocado em temperatura entre 5-7°C, por um período de 10 horas, sendo avaliado após esse período visualmente quanto à ocorrência de coagulação e/ou hemólise (HATTINGH & SMITH, 1976).

Os resultados do percentual de hematócrito, do teor de proteínas plasmáticas totais e da fragilidade osmótica dos eritrócitos foram submetidos à análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A coagulação foi eficientemente inibida quando utilizados o Na₂EDTA 10%, Na₂EDTA 5% e o Na₂EDTA 3%; já as amostras condicionadas com a heparina 100UI foram parcialmente comprometidas 10 horas após a colheita, em razão da coagulação. HATTINGH (1975) reporta a ocorrência de coagulação do sangue acondicionado com heparina quando esta é utilizada em baixas concentrações, coagulando dentro de poucos minutos após a colheita sanguínea. MAINWARING & ROWLEY (1985) observaram a ocorrência de grumos de células quando utilizada a heparina 50UI mL⁻¹. Esse anticoagulante tem sido o mais utilizado nos estudos em hematologia de peixes (TAVARES-DIAS & SANDRIM, 1998; WALENCIK & WITESKA, 2007), contudo pode não ser eficaz em algumas espécies, como em *Micropterus salmonides* (CLARKE et al., 1979) e em surubim híbrido, utilizado no presente estudo. Esse fato também pode ser determinado pela diminuição da atividade anticoagulante após sua homogeneização com o sangue, como descrevem OKUNO & NELSON (1975).

Não houve diferença estatística (P>0,05) no Ht e PPT utilizando-se diferentes anticoagulantes (Tabela 1), contudo houve tendência de aumento

desses parâmetros quanto maior a concentração de Na₂EDTA.

O aumento do volume globular quando utilizado o EDTA é reportado em várias espécies de peixes (HATTINGH, 1975), assim como répteis e aves (HATTINGH & SMITH, 1976; MAFUVADZE & ERLWANGER, 2007). No entanto, em tambaqui *Colossoma macropomum*, os valores do Ht foram inferiores quando utilizado EDTA em comparação com a heparina 5000UI (TAVARES-DIAS & SANDRIM, 1998). De forma semelhante, WALENCIK & WITESKA (2007) encontraram valores inferiores de Ht com Na₂EDTA em *C. carpio*. No entanto, esses autores citam que a intensa hemólise verificada nos microtubos dificultou a determinação desse parâmetro.

Após a estocagem do sangue por um período de 10 horas e avaliação qualitativa, foi verificada moderada hemólise nas amostras condicionadas com Na₂EDTA 10%, discreta hemólise nas amostras acondicionadas com Na₂EDTA 5% e ausência de hemólise quando utilizados Na₂EDTA 3% e heparina. Similarmente ao presente estudo, HATTINGH (1975) reporta a ocorrência de hemólise em peixes determinada pelo uso do EDTA, iniciando a partir de 30 minutos da colheita sanguínea em *Labeo umbratus* e *L. capensis*, de uma a duas horas em *C. carpio* e *Barbus holubi* e a partir de três horas em *Clarias gariepinus*. Os estudos de VAN VLIET et al (1985), assim como de WALENCIK & WITESKA (2007), também relatam a ocorrência de hemólise em *C. carpio*, principalmente quando são utilizadas altas concentrações de EDTA. Esse fato possivelmente ocorre devido à quelação dos íons Ca²⁺ que determina distúrbios na permeabilidade e estabilidade da membrana dos eritrócitos (WALENCIK & WITESKA, 2007).

SARKAR et al. (1999) citaram que a fragilidade osmótica dos eritrócitos é um teste que determina a resistência destes frente ao estresse osmótico. O início da hemólise no presente estudo foi verificado a partir da concentração de 0,45% de NaCl-PO₄ no grupo controle e de heparina, não havendo diferença entre estes. Resultados similares são descritos em *Abramis brama* (WEGRZYNOWICZ et al., 1972) e *C. carpio* (NAGASAKA et al., 2004; WALENCIK & WITESKA, 2007). A utilização de Na₂EDTA determinou o incremento da FOE (P<0,05) independente da concentração testada. A hemólise iniciou-se a partir de 0,65% de NaCl-PO₄, quando foi utilizado o Na₂EDTA (Figura 1), sendo verificado grande aumento do percentual de hemólise na utilização do Na₂EDTA 10% em relação às demais concentrações, assim como em relação à heparina e ao controle.

Tabela 1 - Valores médios e desvios-padrão do hematócrito e do teor de proteínas plasmáticas totais em surubim híbrido (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *P. corruscans*), com a utilização diferentes anticoagulantes.

Anticoagulantes	Hematócrito (%)	Proteínas Plasmáticas Totais (g dL ⁻¹)
Heparina 100UI	25,60 ^a ±5,35	4,66 ^a ±0,55
Na ₂ EDTA 3%	25,80 ^a ±7,32	4,76 ^a ±0,55
Na ₂ EDTA 5%	26,70 ^a ±6,69	4,90 ^a ±0,61
Na ₂ EDTA 10%	27,40 ^a ±6,74	5,14 ^a ±0,51

^aValores com sobrescritos diferentes em uma mesma coluna são estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Tukey (P<0,05).

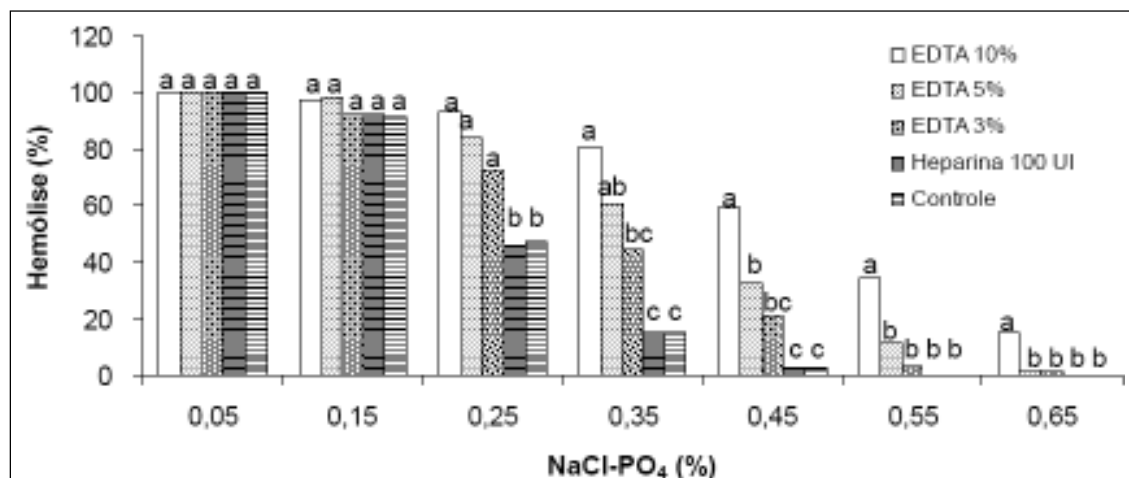


Figura 1 - Fragilidade osmótica dos eritrócitos de surubim híbrido (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *P. corruscans*), com a utilização de diferentes anticoagulantes. Letras minúsculas de NaCl-PO₄ indicam diferença estatisticamente significativa entre os anticoagulantes de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$).

O aumento da fragilidade de eritrócitos, quando utilizado Na₂EDTA a 5 e 10%, corroborou os resultados de WALENCIK & WITESKA (2007) em carpa comum. MAFUVADZE & ERLWANGER (2007), ao estudarem o efeito do K₃EDTA e da heparina de lítio sobre a FOE de avestruzes (*Struthio camelus*), reportaram intenso incremento da fragilidade osmótica dos eritrócitos quando utilizado K₃EDTA, ocorrendo maior fragilidade após o armazenamento por seis e 12 horas. Já em mamífero, SARKAR et al. (1999) observaram que, em iaque (*Bos grunniens*), ocorre discreto aumento da FOE quando utilizado o EDTA, não apresentando diferença em relação à heparina, havendo maior incremento da fragilidade quando utilizado oxalato de amônio.

Por outro lado, HARR et al. (2005) não encontraram diferenças significativas quanto à hemólise entre a heparina e o K₃EDTA para araras (*Ara spp.*) e pítons (*Python molurus bivittatus*), sendo considerados como anticoagulantes adequados para amostras refrigeradas até 12 e 24 horas, respectivamente, salientando a importância do estudo dos efeitos dos anticoagulantes para cada espécie em particular.

CONCLUSÕES

A heparina 100UI foi o anticoagulante mais eficaz para realização do teste de fragilidade osmótica dos eritrócitos em surubim híbrido; no entanto, a viabilidade do sangue acondicionado com esse anticoagulante foi menor que 10h. Dessa forma, esse anticoagulante deve ser utilizado em procedimentos

hematológicos que não demandem o armazenamento do sangue para análises posteriores.

O EDTA 3% foi seguro e eficiente como anticoagulante para surubim híbrido, prevenindo a coagulação por mais de 10h e ocasionando discreta alteração na permeabilidade e regulação osmótica da membrana dos eritrócitos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), ao Aquabrazil/Embrapa, ao Ministério da Pesca e Aquicultura e à Fundect (Processo n. 23/200.321/2008), pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- CLARKE, S. et al. Considerations of blood parameters of largemouth bass, *Micropterus salmonides*. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, Ottawa, v.14, p.147-158, 1979.
- COLLIER, H.B. The standardizations of blood haemoglobin determinations. **Canadian Medical Association Journal**, Ottawa, v.50, n.6, p.550-552, 1944. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1581573/>>. Acesso em: 07 maio, 2010.
- GOLDENFARB, P.B. et al. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determinations. **American Journal of Clinical Pathology**, Philadelphia, v.56, n.1, p.35-39, 1971. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5556212>>. Acesso em: 10 maio, 2010.
- HARR, K.E. et al. Temporal effects of 3 commonly used anticoagulants on hematologic and biochemical variables in blood samples from macaws and Burmese pythons. **Veterinary Clinical Pathology**, Columbia, v.34, n.4, p.383-388, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>

16270264>. Acesso em: 07 maio, 2010. doi: 10.1111/j.1939-165X.2005.tb00065.

HATTINGH, J. Heparin and ethylenediamine tetra-acetate as anticoagulants for fish blood. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, Heidelberg, v.355, n.4, p.347-352, 1975. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/j000r6848510114q/>>. Acesso em: 10 maio, 2010. doi: 10.1007/BF00579855.

HATTINGH, J.; SMITH, E.M. Anticoagulants for avian and reptilian blood: heparin and EDTA. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, v.363, n.3, p.267-269, 1976. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/j60x648k52083r61/>>. Acesso em: 07 maio, 2010. doi: 10.1007/BF00594613.

KORCOCK, D.E. et al. Effects of sampling conditions on selected blood variables of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. **Journal of Fish Biology**, London, v.33, n.2, p.319-330, 1988. Disponível em: <http://link.periodicos.capes.gov.br/sfxlcl3?url_ver=Z39.88-2004&url_ctx_fmt=infofi/fmt:kev:mtx:ctx&ctx_enc=info:ofi/enc:UTF-8&ctx_ver=Z39.882004&rft_id=info:sid/sfxit.com:azlist&sfx.ignore_date_threshold=1&rft.object_id=954922645036&svc.fulltext=yes>. Acesso em: 07 maio, 2010. doi: 10.1111/j.1095-8649.1988.tb05474.

MAFUVADZE, B.; ERLWANGER, K.H. The effect of EDTA, heparin and storage on the erythrocyte osmotic fragility, plasma osmolality and haematocrit of adult ostriches (*Struthio camelus*). **Veterinarski Archiv**, Zagreb, v.77, n.5, p.427-434, 2007. Disponível em: <[http://www.google.com.br/search?q=he+effect+of+EDTA%2C+heparin+and+storage+on+the+erythrocyte+osmotic+fragility%2C+plasma+osmolality+and+haematocrit+of+adult+ostriches+\(Struthio+camelus\)&ie=utf-8&oe=utf-8&aq=t&rls=org.mozilla:pt-BR:official&client=firefox-a](http://www.google.com.br/search?q=he+effect+of+EDTA%2C+heparin+and+storage+on+the+erythrocyte+osmotic+fragility%2C+plasma+osmolality+and+haematocrit+of+adult+ostriches+(Struthio+camelus)&ie=utf-8&oe=utf-8&aq=t&rls=org.mozilla:pt-BR:official&client=firefox-a)>. Acesso em: 10 maio, 2010.

MAINWARING, G.; ROWLEY, A.F. The effect of anticoagulants on *Blennius pholis* L. leucocytes. **Comparative Biochemistry and Physiology**: part A: physiology, v.80, n.1, p.85-91, 1985. Disponível em: <http://link.periodicos.capes.gov.br/sfxlcl3?url_ver=Z39.88-2004&url_ctx_fmt=infofi/fmt:kev:mtx:ctx&ctx_enc=info:ofi/enc:UTF-8&ctx_ver=Z39.882004&rft_id=info:sid/sfxit.com:azlist&sfx.ignore_date_threshold=1&rft.object_id=954926972003&svc.fulltext=yes>. Acesso em: 07 maio, 2010. doi: 10.1016/0300-9629(85)90683-8.

NAGASAKA, R. et al. Partial oxidative-stress perturbs membrane permeability and fluidity of fish nucleated red blood cells. **Comparative Biochemistry and Physiology**: part C: toxicology and pharmacology, Elmsford, v.139, n.4, p.259-266, 2004. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6W89-4F8TK20-1-1&_cdi=6649&_user=7430124&_pii=S1532045604002480&_orig=browse&_coverDate=12%2F01%2F2004&_sk=998609995&view=c&wchp=dGLzVtbzSkzk&md5=efca233f93777fb96bb79c1cb00545c6&ie=/sarticle.pdf>. Acesso em: 07 maio, 2010. doi: 10.1016/j.cca.2004.12.001.

OKUNO, T.; NELSON, C.A. Anticoagulant activity of heparin in intravenous fluids. **Journal of Clinical Pathology**, London, v.28, n.6, p.494-497, 1975. Disponível em: <http://link.periodicos.capes.gov.br/sfxlcl3?url_ver=Z39.88-2004&url_ctx_fmt=infofi/fmt:kev:mtx:ctx&ctx_enc=info:ofi/enc:UTF-8&ctx_ver=Z39.88-2004&rft_id=info:sid/sfxit.com:azlist&sfx.ignore_date_threshold=1&rft.object_id=954925411846&svc.fulltext=yes>. Acesso em: 07 maio, 2010. doi: 10.1136/jcp.28.6.494

PARPART, A.K. et al. The osmotic resistance (fragility) of human red cells. **Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor, v.26, n.4, p.636-640, 1947. Disponível em: <http://link.periodicos.capes.gov.br/sfxlcl3?url_ver=Z39.88-2004&url_ctx_fmt=infofi/fmt:kev:mtx:ctx&ctx_enc=info:ofi/enc:UTF-8&ctx_ver=Z39.88-2004&rft_id=info:sid/sfxit.com:azlist&sfx.ignore_date_threshold=1&rft.object_id=954925411845&svc.fulltext=yes>. Acesso em: 07 maio, 2010. doi: 10.1172/JC1101847.

SARKAR, M. et al. The effect of anti-coagulants on the osmotic fragility of erythrocytes in the Yak (*Poephagus grunniens*). **Veterinary Journal**, London, v.157, n.1, p.91-93, 1999. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6WXN-45KV8KK-F-1&_cdi=7163&_user=7430124&_pii=S109002339890257X&_orig=browse&_coverDate=01%2F31%2F1999&_sk=998429998&view=c&wchp=dGLzVtz-zSkzV&md5=ff84c5333a799a851591935e2f0316d4&ie=/sarticle.pdf>. Acesso em: 07 maio, 2010. doi: 10.1053/tvj.1998.0257.

TAVARES-DIAS, M.; OLIVEIRA, S.R. A review of the blood coagulation system of fish. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.7, n.2, p.205-224, 2009. Disponível em: <http://link.periodicos.capes.gov.br/sfxlcl3?url_ver=Z39.88-2004&url_ctx_fmt=infofi/fmt:kev:mtx:ctx&ctx_enc=info:ofi/enc:UTF-8&ctx_ver=Z39.88-2004&rft_id=info:sid/sfxit.com:azlist&sfx.ignore_date_threshold=1&rft.object_id=1000000000303554&svc.fulltext=yes>. Acesso em: 07 maio, 2010.

TAVARES-DIAS, M.; SANDRIM, E.F.S. Influence of anticoagulants and blood storage on hematological values in tambaqui, *Colossoma macropomum*. **Acta Scientiarum: biological science**, Maringá, v.20, n.2, p.151-155, 1998. Disponível em: <http://link.periodicos.capes.gov.br/sfxlcl3?url_ver=Z39.88-2004&url_ctx_fmt=infofi/fmt:kev:mtx:ctx&ctx_enc=info:ofi/enc:UTF-8&ctx_ver=Z39.88-2004&rft_id=info:sid/sfxit.com:azlist&sfx.ignore_date_threshold=1&rft.object_id=1000000000307086&svc.fulltext=yes>. Acesso em: 07 maio, 2010. doi: 10.4025/actascibiolsci.v20i0.4465.

VAN VLIET, K.J. et al. The effects of generally used anticoagulants on the haemolysis of fish erythrocytes. **Water SA**, Grahamstown, v.11, n.2, p.87-89, 1985. Disponível em: <http://link.periodicos.capes.gov.br/sfxlcl3?url_ver=Z39.88-2004&url_ctx_fmt=infofi/fmt:kev:mtx:ctx&ctx_enc=info:ofi/enc:UTF-8&ctx_ver=Z39.88-2004&rft_id=info:sid/sfxit.com:azlist&sfx.ignore_date_threshold=1&rft.object_id=954925527839&svc.fulltext=yes>. Acesso em: 07 maio, 2010.

WALENCIK, J.; WITESKA, M. The effects of anticoagulants on hematological indices and blood cell morphology of common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Comparative Biochemistry and Physiology**: Part C: toxicology and pharmacology, Elmsford, v.146, n.3, p.331-335, 2007. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6W89-4NHV4MK-2-5&_cdi=6649&_user=7430124&_pii=S1532045607001081&_orig=browse&_coverDate=09%2F30%2F2007&_sk=998539996&view=c&wchp=dGLzVl-zSkWA&md5=Ifc81e5565100f63066a44003428d1c9&ie=/sarticle.pdf>. Acesso em: 07 maio, 2010. doi: 10.1016/j.cbpc.2007.04.004.

WĘGRZYNOWICZ, R. et al. Osmotic fragility of erythrocytes of bream *Abramis brama* (L.) from Zalew Szczecinski. **Acta Ichthyologica et Piscatoria**, Szczecin, v.2, n.1, p.95-100, 1972. Disponível em: <http://link.periodicos.capes.gov.br/sfxlcl3?url_ver=Z39.88-2004&url_ctx_fmt=infofi/fmt:kev:mtx:ctx&ctx_enc=info:ofi/enc:UTF-8&ctx_ver=Z39.88-2004&rft_id=info:sid/sfxit.com:azlist&sfx.ignore_date_threshold=1&rft.object_id=110975506069571&svc.fulltext=yes>. Acesso em: 07 maio, 2010.